

BEST AVAILABLE COPY

世界知识产权组织
国际局

PCT

按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请



<p>(51) 国际专利分类号: C07H 21/00, 21/04</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国际公布号: WO99/20641 (43) 国际公布日: 1999年4月29日(29.04.1999)</p>
<p>(21) 国际申请号: PCT/CN98/00248 (22) 国际申请日: 1998年10月19日(19.10.1998) (30) 优先权: 97106667.1 1997年10月21日(21.10.1997) CN (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国科学院上海生物化学研究所(SHANGHAI INSTITUTE OF BIO-CHEMISTRY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, 邮政编码:200031, Shanghai (CN). (72) 发明人;及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 陆长德(LU, Changde) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, 邮政编码:200031, Shanghai (CN). (74) 代理人: 上海华东专利事务所(SHANGHAI HUA DONG PATENT AGENCY); 中国上海市岳阳路319号, 邮政编码:200031, Shanghai (CN).</p>		<p>(81) 指定国: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) 本国际公布: 包括国际检索报告。</p>
<p>(54) Title: NEW TRIPLEX FORMING OLIGONUCLEOTIDES AND THEIR USE IN ANTI-HBV (54) 发明名称: 新的三螺旋形成寡核苷酸及其在抗乙肝病毒中的应用 (57) Abstract New triplex forming oligonucleotides (TFO) are disclosed, which can form triplex DNA with two homopoly purine/homopoly pyrimidine fragments similar to TFO. TFO that can bind DR region of HBV and promotor region of pre-S gene are designed by this way. The oligonucleotides can also be monophosphorylated and chemically modified by other method at its 3' terminal to enhance its stability. The cell tests demonstrate that TFO can be useful for inhibition HBV and used as drugs for treating hepatitis B. (DNA)??RNA hybrid triplex can also be formed by incorporating negative deoxynucleotide strand of the same region which act on target sequence of RNA with TFO in order to inhibit HBV more effectively.</p>		

(57) 摘要

一种新的三螺旋形成寡核苷酸(TFO), 它能与二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列形成三螺旋 DNA。用上述结构设计了分别与 HBV 的 DR 区域及前 S 基因的启动子区域结合的 TFO。在其 3'端也可用单磷酸化及其他化学修饰以增加稳定性。细胞实验证明该 TFO 可应用于抑制 HBV 及用作治疗乙型肝炎的药物。也可同时加入同一区域的负链序列脱氧寡核苷酸与 TFO 一起作用于 RNA 上的靶序列形成 (DNA)₂: RNA 杂合三螺旋结构, 使抑制 HBV 更有效。

以下内容仅供参考

在按照 PCT 所公布的国际申请小册子首页上所采用的 PCT 成员国国家代码如下:

AE 阿拉伯联合酋长国	DK 丹麦	KP 朝鲜民主主义人民共和国	PT 葡萄牙
AL 阿尔巴尼亚	EE 爱沙尼亚	KR 韩国	RO 罗马尼亚
AM 亚美尼亚	ES 西班牙	KZ 哈萨克斯坦	RU 俄罗斯联邦
AT 奥地利	FI 芬兰	LC 圣卢西亚	SD 苏丹
AU 澳大利亚	FR 法国	LI 列支敦士登	SE 瑞典
AZ 阿塞拜疆	GA 加蓬	LK 斯里兰卡	SG 新加坡
BA 波斯尼亚-黑塞哥维那	GB 英国	LR 利比里亚	SI 斯洛文尼亚
BB 巴巴多斯	GD 格拉纳达	LS 莱索托	SK 斯洛伐克
BE 比利时	GE 格鲁吉亚	LT 立陶宛	SL 塞拉利昂
BF 布基纳法索	GH 加纳	LU 卢森堡	SN 塞内加尔
BG 保加利亚	GM 冈比亚	LV 拉托维亚	SZ 斯威士兰
BJ 贝宁	GN 几内亚	MC 摩纳哥	TD 乍得
BR 巴西	GR 希腊	MD 摩尔多瓦共和国	TG 多哥
BY 白俄罗斯	GW 几内亚比绍	MG 马达加斯加	TJ 塔吉克斯坦
CA 加拿大	HR 克罗地亚	MK 前南斯拉夫马其顿共和国	TM 土库曼斯坦
CF 中非共和国	HU 匈牙利	ML 马里	TR 土耳其
CG 刚果	ID 印度尼西亚	MN 蒙古	TT 特立尼达和多巴哥
CH 瑞士	IE 爱尔兰	MR 毛里塔尼亚	UA 乌克兰
CI 科特迪瓦	IL 以色列	MT 马耳他	UG 乌干达
CM 喀麦隆	IN 印度	MX 墨西哥	US 美国
CN 中国	IS 冰岛	NE 尼日尔	UZ 乌兹别克斯坦
CU 古巴	IT 意大利	NL 荷兰	VN 越南
CY 塞浦路斯	JP 日本	NO 挪威	YU 南斯拉夫
CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	NZ 新西兰	ZA 南非
DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	PL 波兰	ZW 津巴布韦

新的三螺旋形成寡核苷酸及其在抗乙肝病毒中的应用

技术领域

本发明涉及一种新的三螺旋形成寡核苷酸，尤指一种新的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物与二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列形成三螺旋 DNA 结构及其在抗乙型肝炎病毒中的应用。

技术背景

80 年代，发现在体内的均聚嘌呤或均聚嘧啶序列双链 DNA 可以反折过来，其中一条链与 5' 上游的均聚嘌呤或均聚嘧啶的双链 DNA 形成三螺旋 DNA，而与之配对的另一条链则成为单链，而且三螺旋 DNA 还参与了基因表达的调控(Lyamichev VI, Mirkin SM, et al., J Biomol Struct Dyn, 1986, 3: 667-9. Larsen A, Weintraub H, et al., Cell, 1982, 29: 609-22. Htun H, Dahlberg JE. Science, 1989, 243: 1571-76.)。在体外也可以通过寡核苷酸与特异的靶 DNA 识别，形成三螺旋 DNA，一条均聚嘌呤或均聚嘧啶的寡核苷酸链能够以碱基配对的方式特异地识别相应的均聚嘌呤/均聚嘧啶的双链 DNA 序列，以 Hoogsteen 键或反 Hoogsteen 键与双链 DNA 中的嘌呤链结合形成稳定的三螺旋 DNA 结构。与双链 DNA 形成三螺旋 DNA 的寡核苷酸片段则称为三螺旋形成寡核苷酸(Triplex Forming Oligonucleotide, TFO)，三螺旋 DNA 的形成可以阻抑蛋白因子与 DNA 结合。用末端带有 EDTA-Fe²⁺ 的 TFO 与特异的靶序列结合形成三螺旋 DNA，还能在三螺旋 DNA 形成的位置特异地切断靶双链 DNA(Moser HE, Dervan PB., Science, 1987, 238: 645-50.)。因此通过三螺旋 DNA 的形成，有望在 DNA 水平抑制基因表达，即所谓的抗基因策略 (Antigene Strategy)。它与反义技术及核酶相比，有其优越性。三螺旋形成寡核苷酸是以双链 DNA 的特定序列为结合位点，通过与特定的双链 DNA 序列形成三螺旋 DNA 或在三螺旋 DNA 的位置上切断靶 DNA，抑制基因转录或复制。反义核酸及核酶

均是以 mRNA 为作用靶, 通过与 mRNA 结合以阻断翻译或促进 mRNA 降解的方式来达到阻断基因表达的目的。在细胞中, 一个拷贝 DNA 可以转录出多个 mRNA 拷贝。因此, 在 DNA 水平阻断基因的复制或转录方面可能更为有效。根据三螺旋 DNA 形成的原理及配对规则, 在某一特定基因的启动子中设计三螺旋形成寡核苷酸片段与靶基因的特定序列形成三螺旋 DNA, 阻碍 DNA 与蛋白质结合或在某一特定部位设计三螺旋形成寡核苷酸片段与其特定序列形成三螺旋 DNA, 阻碍复制、转录复合体通过, 可以抑制 DNA 复制或 RNA 的转录。1988 年 Cooney 等证实在人 c-myc 基因起始位点形成的分子间三螺旋结构可抑制 c-myc 的转录(Cooney,M., Science,1988,241:450-9)。然而, 至今还很少有利用 TFO 抑制基因表达的实际应用。查阅各国专利, 仅有一项专利涉及用 TFO 抑制雄激素受体基因的表达(US.5556956, 1996,9,17)。其主要原因是在基因的启动子或在某些特定区域中很少有足够长的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列。较短的 TFO 与较短的双链靶 DNA 形成的三螺旋 DNA 稳定性和专一性不高, 因而其抑制作用也不强, 限制了抗基因策略的实际应用。对于扩大三螺旋 DNA 形成的靶 DNA 范围仅作了一些理论的研究, 并无实际应用。Horne 和 Dervan 等设计了一种交替式的三螺旋 DNA, 即两段均聚嘌呤序列位于双链 DNA 的两条链上, TFO 的一部分与双链中的一条嘌呤链配对, 而 TFO 的另一部分则与双链中的另一条嘌呤链配对 (Horne, D.A., Dervan, P.B., J. Am.Chem. Soc., 1990,112,2435-37.)。对于三螺旋 DNA 形成的稳定性, 也有人进行了研究。发现虽然含有单个错配碱基仍然可以形成三螺旋 DNA, 但其稳定性明显降低。因此, 研究新的 TFO 结构并用于抑制有害基因的表达仍是要解决的问题。也有人研究了 TFO 的化学修饰来提高 TFO 的稳定性及抑制作用, 包括硫磷酸修饰(Tu,et al., J.Biol.Chem.,1995,270:28402-7), 3'接一个氨基酸(Orsen,F.M. et al., Nucleic Acids Res.,1991, 19:3435-41; Postel,E.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:8827-31; McShan,W.M. et al., J. Biol. Chem., 1992, 267:5712-

21), 3'接胆固醇(Ing, N.H. et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21:2789-96.)等。虽然一些化学修饰可以提高 TFO 的稳定性及抑制作用, 但 TFO 的长度仍然是决定 TFO 的稳定的最主要的因素。

HBV 是一种嗜肝性 DNA 病毒, 其感染可引起急性或慢性肝炎。肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)患者中, 有 80% 是 HBV 感染者, 受 HBV 慢性感染的人群患 HCC 的相对危险性至少增加 100 倍。我国是乙型肝炎高流行区, 有大约 8-10% 的人群(约 1 亿人口)为乙型肝炎(病毒)表面抗原(Hepatitis B (virus) Surface Antigen, HBsAg)的阳性者。由 HBV 感染引起的乙型肝炎与其相关的 HCC 是世界性的主要健康问题之一。但是, 到目前为止, 临床上仍缺乏有效的治疗方法。因此, 发展抗 HBV 的三螺旋形成寡核苷酸作为研究新的治疗方法也是当今的科研方向。但在 HBV 基因中没有足够长的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列可以作为三螺旋形成寡核苷酸的作用靶, 所以寻找一种新的三螺旋 DNA 结构是一个很有意义的科研工作。

发明目的

本发明的目的是提供一种能与二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列形成三螺旋 DNA 结构的三螺旋形成寡核苷酸。该三螺旋形成寡核苷酸能够抑制乙型肝炎病毒基因的表达及乙型肝炎病毒的繁殖, 它包括二类分别能与 HBV 的 DR 区域及 HBV adr 亚型的前 S 基因启动子区域的二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合的三螺旋形成寡核苷酸。它们还能通过 3'单磷酸化修饰或其他化学修饰以提高稳定性。该三螺旋形成寡核苷酸可应用于作为治疗乙型肝炎的药物。

发明内容

本发明提供一种能与二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列形成三螺旋 DNA 结构的三螺旋形成寡核苷酸。根据三螺旋 DNA 形成的原理及 HBV 基因序列,

针对 HBV 的 DR 区域及 HBVadr 亚型的前 S 基因启动子区域的二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列, 本发明设计了相应的三螺旋形成寡核苷酸, 并在 DNA 合成仪上合成了相应的三螺旋形成寡核苷酸及 3' 单磷酸化修饰的三螺旋形成寡核苷酸: (参见图 1 和图 2)

- B1** 5' AAG GAG GAG GAT GGA GG 3' 17nt
B2 5' AAG GAG GAG GAC GGA GG 3' 17nt
B3 5' AAG GAG GAG GAA GGA GG 3' 17nt
B4 5' AAG GAG GAG GAG GGA GG 3' 17nt
B5 5' AAG GAG GAG GA 3' 11nt
B11 5' AGA GGA GGG GG 3' 11nt
B12 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGG 3' 21nt
B13 5' AGA GGA GGG GGG GGA GGA GGG 3' 21nt
B14 5' AGA GGA GGG GGC CGA GGA GGG 3' 21nt
B15 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGG 3' 21nt
B1(3'P) 5' AAG GAG GAG GAT GGA GGp 3' 17nt
B2(3'P) 5' AAG GAG GAG GAC GGA GGp 3' 17nt
B3(3'P) 5' AAG GAG GAG GAA GGA GGp 3' 17nt
B4(3'P) 5' AAG GAG GAG GAG GGA GGp 3' 17nt
B5(3'P) 5' AAG GAG GAG GAp 3' 11nt
B11(3'P) 5' AGA GGA GGG GGp 3' 11nt
B12(3'P) 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGp 3' 21nt
B13(3'P) 5' AGA GGA GGG GGG GGA GGA GGp 3' 21nt
B14(3'P) 5' AGA GGA GGG GGC CGA GGA GGp 3' 21nt
B15(3'P) 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGp 3' 21nt

为了研究三螺旋形成寡核苷酸与 HBV 的 DR 区域及前 S 基因启动子区域的两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合的能力, 本发明用凝胶电泳条带移位(Band mobility shift assays)的方法测定了三螺旋

DNA形成的热力学参数。TFO B1-B5 都能与 HBV 的前 S 基因的两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合。其中 TFO B1-B4 强于 B5, B4 的作用最强。TFO B11, B12 及 B15 都能与 HBV 的 DR 区域的两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合, 其中 TFO B15 和 B12 强于 B11, B15 的作用最强。B5 和 B11 分别只与 HBV adr 亚型的前 S 基因及 DR 区域的一段均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合, TFO B1-B4 强于 B5 说明 TFO B1-B4 能与 HBV 的前 S 基因的两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合。另一个对照的寡核苷酸 TFOB6, 它的 3' 端比 B5 多了 8 个 T, 不能与第二段均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合, 它与靶序列的结合明显弱于 B5, 也证明了这一点。同样, TFO B15 和 B12 强于 B11, 说明 TFO B15 和 B12 能与 HBV 的 DR 区域的两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合。这些结果说明本发明设计的三螺旋形成寡核苷酸可以与两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合形成一种新的三螺旋 DNA 结构, 而且, 结合强的 TFO 中碱基也是以 Hoogsteen 键或反 Hoogsteen 键原则与靶双链 DNA 配对的。本发明的新的三螺旋形成寡核苷酸与 HBV 的 DR 区域及 HBV adr 亚型前 S 基因的两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合时靶双链 DNA 结构有从嘌呤到嘧啶到嘌呤的转折。这一转折虽然使三螺旋 DNA 的稳定性有所降低, 但延长了三螺旋形成寡核苷酸最终与靶双链 DNA 结合的稳定性及专一性都大大得到了提高, 因而其抑制作用也更强。这也证明影响形成的三螺旋 DNA 的稳定性最主要因素是三螺旋形成寡核苷酸的长度。

为了研究三螺旋形成寡核苷酸对于 HBV 基因表达及病毒自身繁殖的抑制作用, 本发明采用含 HBV 基因的质粒(p1.2II) 转染到肝来源的 HepG2 细胞作为研究的模型来研究三螺旋形成寡核苷酸的作用。质粒(p1.2II) 含有 1.2 倍长度的 HBV(adr 亚型)基因克隆, 包括全长的 HBV 基因组及 1403~1983 的重叠区, 它能表达所有的 HBV mRNA。p1.2II 转染到 HepG2 细胞中之后, 可以产

生完整的有感染活力的病毒颗粒。用已有的测定试剂盒测定 HBsAg 和 HBeAg 的表达量,可以观察三螺旋形成寡核苷酸对 HBV 基因表达的抑制作用,测定细胞中 HBV 病毒 DNA 的拷贝数,可以观察三螺旋形成寡核苷酸对 HBV 病毒繁殖的抑制作用。

考虑到血清中及细胞内有较高活性的核酸水解酶,可以通过对三螺旋形成寡核苷酸进行化学修饰,例如硫磷酸修饰、甲基磷酸修饰、2'-O-甲基修饰、3' 单磷酸化修饰等,以提高其稳定性。由于血清中主要为 3'→5'核酸外切酶,它要求 3'端为 OH 基团的核酸为底物,根据发明人以前的研究成果(参见发明专利申请号 97106495.4,申请日 1997 年 6 月 28 日),采取 3'单磷酸化修饰寡核苷酸为最佳修饰衍生物,当寡核苷酸 3'的 OH 基团被磷酸化后,不能作为 3'→5'核酸外切酶的底物,延长了其在血清中及细胞内的滞留时间,因此能够更有效地与目的基因相结合。在血清中和细胞内 3'磷酸化修饰的寡核苷酸的稳定性明显高于不修饰的寡核苷酸,略高于硫磷酸修饰的寡核苷酸,3'磷酸化修饰的寡核苷酸被细胞摄取的能力高于不修饰的寡核苷酸及硫磷酸修饰的寡核苷酸。此外,由于 3'磷酸化修饰的寡核苷酸不带非天然的修饰成份,其代谢降解产物无任何毒副作用,因此更为优越与安全,是一种更好的修饰方式。本发明选择与靶序列结合最强的三螺旋形成寡核苷酸 B4(3'P)和 B15(3'P)为代表研究三螺旋形成寡核苷酸对 HBV 基因表达的抑制作用和对 HBV 病毒繁殖的抑制作用。研究结果证明本发明合成的三螺旋形成寡核苷酸能够抑制 HBV 基因的表达以及 HBV 病毒 DNA 的复制,从而抑制乙型肝炎病毒的繁殖,因此,可应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

此外,HBV 是一种基因安排得非常紧密的病毒,它的 4 种启动子序列都与编码区重叠。而且它的转录产物,即 4 种长度分别为 3.5kb, 2.4kb, 2.1kb, 0.8kb 的 mRNA 都有共同的 3' 末端。3.5kb 的前基因 RNA 的 3' 末端是病毒反转录成 DNA 的模板。本发明提供的 HBV 的 2 个靶序列也都存在于 3.5kb

的前基因 RNA 中。DR 区在 3.5kb 的前基因 RNA 的 3' 端, 前 S 基因区在 3.5kb 的前基因 RNA 的中间。同时加入 DR 区域的负链序列寡核苷酸: AsDR 5' TCT CCT CCC CCA ACT CCT CCC3'或其修饰衍生物, 它与三螺旋形成寡核苷酸 B15 (或 B12, B11) 及其修饰衍生物一起可以作用于 RNA 上的靶序列而形成 (DNA)₂:RNA 杂合三螺旋。或同时加入前 S 区域的负链序列寡核苷酸: AsPS 5'GGA GGC AGG AGG AGG AA 3'或其修饰衍生物, 它与三螺旋形成寡核苷酸 B4(或 B1, B2, B3, B5)及其修饰衍生物一起可以作用于 RNA 上的靶序列而形成 (DNA)₂:RNA 杂合三螺旋。或同时加入 DR 区域的负链序列寡核苷酸: AsDR (3'P) 5' TCT CCT CCC CCA ACT CCT CCCp 3', 它与三螺旋形成寡核苷酸 B15 (3'P) (或 B12 (3'P), B11(3'P)) 一起可以作用于 RNA 上的靶序列而形成 (DNA)₂: RNA 杂合三螺旋。或同时加入前 S 区域的负链序列寡核苷酸: AsPS (3'P) 5' GGA GGC AGG AGG AGG AAP 3', 它与三螺旋形成寡核苷酸 B4 (3'P) (或 B1(3'P), B2(3'P), B3(3'P), B5(3'P)) 一起可以作用于 RNA 上的靶序列而形成 (DNA)₂: DNA 杂合三螺旋。DNA 上的这一段 (DNA)₂:RNA 杂合三螺旋结构可以阻抑复制体的通过, 达到抑制从病毒 RNA 反转录成 DNA 的作用。其结果是增强了三螺旋形成寡核苷酸抗乙型肝炎病毒的作用。

因此, 对于 HBV, 将三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物与同一区域的负链序列寡核苷酸一起应用既可以抑制 HBV 基因的转录, 又可以在前基因 RNA 的靶序列上形成杂合三螺旋, 抑制 DNA 反转录, 最终能更有效地抑制乙型肝炎病毒的繁殖。因而三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物 B4 (或 B1, B2, B3, B5), 可以与 AsPS 一起应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物, B15(或 B11, B12) 可以与 AsDR 一起应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物 B4(3'P) (或 B1(3'P), B2(3'P), B3(3'P), B5(3'P)), 可以与 AsPS(3'P)一起应用于配制抑制乙肝病毒

及治疗乙型肝炎的药物。B15(3'P) (或 B11(3'P), B12(3'P)) 可以与 AsDR(3'P) 一起应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

本发明的优点在于:

1. 提供了一种能与两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列形成三螺旋 DNA 结构的寡核苷酸及其修饰衍生物, 由于增加了寡核苷酸的长度, 因而可以提高形成三螺旋 DNA 的稳定性和专一性。由于能与两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列形成三螺旋 DNA 结构, 因而扩展了三螺旋形成寡核苷酸的抗基因策略的应用范围。

2. 提供了一种三螺旋形成寡核苷酸, 它能抑制乙型肝炎病毒基因的表达及乙型肝炎病毒的繁殖。这是一种直接抑制乙型肝炎病毒基因的表达及病毒的繁殖的物质, 为乙型肝炎的治疗提供了新的方法。

3. 用三螺旋形成寡核苷酸抑制 HBV 基因的表达及病毒的繁殖具有专一性高的特点, 而不会对人体细胞本身产生影响。

4. 本发明提供的三螺旋形成寡核苷酸还可以通过在 3' 末端加上一个磷酸提高其在体内的稳定性。使它们的抑制作用更加明显。由于本发明三螺旋形成寡核苷酸不含非天然的修饰成分, 其降解产物不会对人体产生毒副作用。

5. 同时加入同一区域的负链序列寡核苷酸, 它与三螺旋形成寡核苷酸一起可以作用于 RNA 上的靶序列而形成 (DNA)₂:RNA 杂合三螺旋结构, 此结构可以阻抑复制体的通过, 抑制从病毒 RNA 反转录成 DNA, 增强了三螺旋形成寡核苷酸抗乙型肝炎病毒的作用。

附图说明

图 1 HBV 前 S 基因的 21 bp 双链序列及设计的三螺旋形成寡核苷酸序列。

序列上的数字表示有下划线的碱基在 HBV 基因中的位置, 粗斜体碱基为

基因中插入的不同性质配对及在 TFO 中相应位置插入的碱基。

图 2 HBV DR 区域的 25 bp 双链序列及设计的三螺旋形成寡核苷酸序列。

序列上的数字表示有下划线的碱基在 HBV 基因中的位置，粗斜体碱基为基因中插入的不同性质配对及在 TFO 中相应位置插入的碱基。

图 3 HBV 前 S 基因的 21 bp 双链序列与 TFO B1-B6 形成三螺旋 DNA 的凝胶电泳分析。A,B,C,D,E,F,G 分别是 TFOB1-B6 和对照寡核苷酸(NC)与双链 DNA 结合的结果。照片旁的 S,D,T 分别表示单链、双链和三螺旋 DNA 的位置。照片底部的 S 为不加 TFO 的单链 DNA 对照；D 为不加 TFO 的双链 DNA 对照；1-7 中所用的 TFO 的浓度分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μ mol/L。

图 4 HBV 前 S 基因的 21 bp 双链序列与 TFO B1-6 形成三螺旋 DNA 时三螺旋 DNA 与双链 DNA 之比 $f/(b-f)$ 与 TFO 浓度 a 的关系曲线。

图 5 HBV DR 区域的 25 bp 双链序列与 TFO B11-15 形成三螺旋 DNA 的凝胶电泳分析。

A,B,C,D,E 分别是 TFO B11-B15 与双链 DNA 结合的结果。其余同图 3。

图 6 HBV DR 区域的 25 bp 双链序列与 TFO B11-15 形成三螺旋 DNA 时三螺旋 DNA 与双链 DNA 之比 $f/(b-f)$ 与 TFO 浓度 a 的关系曲线。

图 7 三螺旋形成寡核苷酸对 HBsAg 表达抑制的时间曲线。

三螺旋形成寡核苷酸或对照脱氧寡核苷酸浓度为 10 μ mol/L。不加寡核苷酸(\times)，加 B4(3'P)(\blacklozenge)，加 B15(3'P)(\blacksquare)，对照脱氧寡核苷酸(\blacktriangle)。

图 8 三螺旋形成寡核苷酸对 HBeAg 表达抑制的时间曲线。

三螺旋形成寡核苷酸或对照脱氧寡核苷酸浓度为 10 μ mol/L。不加寡核苷酸(\times)，加 B4(3'P)(\blacklozenge)，加 B15(3'P)(\blacksquare)，对照脱氧寡核苷酸(\blacktriangle)。

图 9 TFO B15(3'P)对预转染 HBV 质粒的 HepG₂ 细胞中 HBsAg 表达的抑制作用。

三螺旋形成寡核苷酸 B15 的浓度为 10 μ mol/L。

图 10 TFO B15(3'P)对预转染 HBV 质粒的 HepG₂ 细胞中 HBeAg 表达的抑制作用。

三螺旋形成寡核苷酸 B15 的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 11 点杂交检测 HepG₂ 细胞中 HBV DNA。

1: 不加寡核苷酸; 2: 加 TFO B4(3'P); 3: 加 TFO B15(3'P); 4: 加对照寡核苷酸

最佳实施例

实施例 1 三螺旋形成寡核苷酸的设计、合成及纯化

1-1 三螺旋形成寡核苷酸片段的设计

在乙型肝炎病毒 adr 亚型的 3127-3143 核苷酸的位置有一段 17bp 的序列, 除其中第 12 位插入一个胞嘧啶外, 均为嘌呤 (如图 1 所示)。根据三螺旋 DNA 的配对规则, 合成了两条互补的乙肝病毒前 S 基因片段 (片段 I, 片段 II)、一系列三螺旋形成寡核苷酸片段 (TFO B1 - B6) 及对照寡核苷酸 (NC), 其中 TFO B1 - B4 在前 S 基因片段胞嘧啶的相应位置分别采用胸腺嘧啶, 胞嘧啶, 腺嘌呤或鸟嘌呤, 以确定哪个碱基能较好地与 G.C 配对, 形成较稳定的三碱基体, 从而使其形成的三螺旋 DNA 具有较高的稳定性; TFO B6 与 TFO B1 - B4 5'端的 11 个核苷酸相同, 都是嘌呤核苷酸, 可以与前 S 基因片段形成三螺旋 DNA, 而 TFO B6 3'端的 8 个核苷酸均为 T, 不能与前 S 基因片段形成三螺旋 DNA。通过比较 TFO B1 - B4 及 TFO B6 与前 S 基因片段形成三螺旋 DNA 的稳定性, 可以了解 TFO B1 - B4 的 3'端能否与前 S 基因片段形成三螺旋 DNA, 从而知道在均聚嘌呤/均聚嘧啶序列的双链 DNA 中, 如果有一个不同性质的碱基插入时, 三螺旋 DNA 形成是否中断, NC 为对照寡核苷酸。

在乙型肝炎病毒基因组的 DR 区域, 1734-1754 位核苷酸的位置有一段 21bp 的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列, 其 5'端 11bp 和 3'端 8bp 为均聚嘌呤/均聚嘧

啉序列, 在 12、13 位插入相反的两个 AT 对(如图 2 所示)。根据三螺旋 DNA 的配对规则, 合成了两条互补的乙肝病毒 Dr 基因片段(片段Ⅲ, 片段Ⅳ)及一系列三螺旋形成寡核苷酸片段 TFO B11-B15, 其中 TFO B12-B15 在 DR 区域片段中 TT 的相应位置分别采用 AA, GG, CC 或 TT, 以确定哪个碱基能较好地与两个 AT 配对, 形成较稳定的三碱基体, 从而使其形成的三螺旋 DNA 具有较高的稳定性; 通过比较 TFO B12-B15 及 B11 与 DR 区域片段形成三螺旋 DNA 的稳定性, 可以了解 TFO B12-B15 3'端的 8 个碱基能否与 DR 区域片段形成三螺旋 DNA, 从而知道在均聚嘌呤/均聚嘧啶序列的双链 DNA 中, 如果有两个不同性质的碱基插入时, 其两侧的碱基是否能同时与靶 DNA 形成三螺旋 DNA。

1-2 三螺旋形成寡核苷酸的末端修饰

对上述 TFO B1-B5 及 TFO B11-B15 寡核苷酸采取 3'单磷酸化修饰。

1-3 三螺旋形成寡核苷酸的合成及纯化

寡核苷酸在 PE 公司生产的 DNA 合成仪(ABI391-EP)上, 用亚磷酸酰胺三酯法合成, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。

1-3-1 3'-OH 寡核苷酸的合成

用 0.2 μ mole 固相柱 (Glen Research 产品), 在 ABI 391EP DNA 合成仪上用 0.2 μ mole 合成顺序合成。

1-3-2 3'单磷酸化修饰寡核苷酸的合成

使用 0.2 μ mole 3'磷酸固相柱 (3'-phosphate CPG Glen Research 公司产品, 全称 2-[2-(4,4'-二甲基三苯甲氧基)乙磺酰]乙基-丁二酰长链烷基胺-微孔玻璃珠 (2-[2-(4,4'-Dimethoxytrityloxy) ethylsulfomyl]ethyl-succinoyl long chain alkylamino-CPG), 用相同的合成顺序合成。

1-3-3 本实验所合成的脱氧寡核苷酸包括:

片段 I 5' CA TTC CTC CTC CTG CCT CC AC 3' 21nt

片段 II 3' GT AAG GAG GAG GAC GGA GG TG 5' 21nt

B1 5' AAG GAG GAG GAT GGA GG 3' 17nt

B2 5' AAG GAG GAG GAC GGA GG 3' 17nt

B3 5' AAG GAG GAG GAA GGA GG 3' 17nt

B4 5' AAG GAG GAG GAG GGA GG 3' 17nt

B5 5' AAG GAG GAG GA 3' 11nt

B6 5' AAG GAG GAG GAT TTT TTT T 3' 19nt

B1(3'P) 5' AAG GAG GAG GAT GGA GGp 3' 17nt

B2(3'P) 5' AAG GAG GAG GAC GGA GGp 3' 17nt

B3(3'P) 5' AAG GAG GAG GAA GGA GGp 3' 17nt

B4(3'P) 5' AAG GAG GAG GAG GGA GGp 3' 17nt

B5(3'P) 5' AAG GAG GAG GAp 3' 11nt

对照 5' GGG ATG CAG TGG TGG AAT TCC ACA 3' 24nt

片段 III 5' AA TCT CCT CCC CCA ACT CCT CCC AG 3' 25nt

片段 IV 3' TT AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGG TC 5' 25nt

B11 5' AGA GGA GGG GG 3' 11nt

B12 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGG 3' 21nt

B13 5' AGA GGA GGG GGG GGA GGA GGG 3' 21nt

B14 5' AGA GGA GGG GGC CGA GGA GGG 3' 21nt

B15 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGG 3' 21nt

B11(3'P) 5' AGA GGA GGG GGp 3' 11nt

B12(3'P) 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGGp 3' 21nt

B13(3'P) 5' AGA GGA GGG GGG GGA GGA GGGp 3' 21nt

B14(3'P) 5' AGA GGA GGG GGC CGA GGA GGGp 3' 21nt

B15(3'P) 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGGp 3' 21nt

实施例 2 三螺旋形成寡核苷酸与靶双链 DNA 结合

2-1 方法

2-1-1 寡核苷酸片段的标记及 ^{32}P 标记的双链片段的纯化

取 50 pmol 寡核苷酸片段 I(或 III), 加 50 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 2 u T4 多聚核苷酸激酶, 1 μl $10 \times \text{T4 Forward Buffer}$, 加双蒸水至 10 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 小时, 取 4 μl 于冰浴中, 另外 6 μl 加入 50 pmol 寡核苷酸片段 II(或 IV), 100 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟, 缓慢退火, 然后走 15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 做好同位素标记, 放射自显影, 切割含寡核苷酸片段 I 及 II(或 III 及 IV)双链 DNA 条带, 压碎凝胶, 加 500 μl 蒸馏水, 在旋转仪上浸泡过夜, 过玻璃棉小柱, 去除凝胶碎片, 滤过液测定同位素放射性强度并加未标记的双链 DNA 片段至 1 pmol/ μl , -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

2-1-2 三螺旋 DNA 的形成及凝胶电泳阻滞试验

在 10 μl 反应体系中含 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ^{32}P 标记的双链 DNA 片段, 10 mmol/L Tris.HCl pH 7.5, 0.5 mmol/L Spermidine, 10 mmol/L MgCl_2 , 分别加入 0、1、2、3、4、5、6、7 $\mu\text{mol/L}$ 不同的 TFO, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 4 小时, 冰浴 10 分钟, 走 15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、电压 100 伏特, 电泳 4 小时, 然后放射自显影。密度扫描计上分析各条带的黑度。在研究外界条件对三螺旋 DNA 形成的影响时改变为相应的条件, 电泳条件相同。

2-1-3 三螺旋 DNA 形成的结合常数(K_a)、解离常数(K_d)及自由能变化(ΔG)的计算

寡核苷酸与双链 DNA 结合的化学反应式为: $\text{TFO} + \text{双链 DNA} = \text{三螺旋 DNA}$, 假设三螺旋形成寡核苷酸与双链 DNA 的起始浓度分别为 a 和 b , 平衡后三螺旋 DNA 的浓度为 f , 那么, 平衡后三螺旋形成寡核苷酸及双链 DNA 的浓度分别为 $(a-f)$ 及 $(b-f)$ 。那么, $K_a = \frac{f}{(a-f)(b-f)}$, 当 $a \gg f$ 时, $a-f \approx a$, 那么,

$K_a = \frac{f}{a(b-f)}$, $(\frac{f}{b-f}) = K_a \times a$, 以 $(\frac{f}{b-f})$ 对 a 作图, 可得一直线, 其斜率为

K_a 。 $K_d = \frac{1}{K_a}$, $\Delta G = -RT \ln K_a$, R 为气体常数, T 为绝对温度, 可计算三螺旋 DNA 形成的自由能变化 ΔG 。

2-2 实验结果及分析

2-2-1 TFO 与乙肝病毒前 S 基因两段相近均聚嘌呤/均聚嘧啶序列的作用

2-2-1-1 TFO 与标记的乙肝病毒前 S 双链基因片段形成三螺旋 DNA 及凝胶阻滞分析

寡核苷酸片段 I 经 5' 末端 ^{32}P 标记后部分与片段 II 复性, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化得到 ^{32}P 标记的寡核苷酸单链及 ^{32}P 标记的乙肝病毒前 S 基因双链片段。用合成的寡核苷酸与 ^{32}P 标记的乙肝病毒前 S 基因双链片段进行凝胶阻滞分析, 本发明设计合成的寡核苷酸除对照寡核苷酸 NC 之外, 其它的寡核苷酸 B1、B2、B3、B4、B5、B6 均可与乙肝病毒基因片段形成三螺旋 DNA, 如图 3 所示。

2-2-1-2 TFO 与乙肝病毒前 S 基因形成三螺旋 DNA 的平衡常数、解离常数及自由能变化

通过对放射自显影结果进行黑度扫描, 计算出三螺旋 DNA 形成反应平衡之后双链 DNA 及三螺旋 DNA 的浓度 $[b-f]$ 及 $[f]$, 然后, 以 $(\frac{f}{b-f})$ 对 a 作图, 可得一直线, 其斜率为 K_a (如图 4 所示)。通过 K_a 值计算 K_d 及 ΔG , $K_d = \frac{1}{K_a}$,

$\Delta G = -RT \ln K_a$ 。如表 1 所示:

表 1. TFO 与 HBV 前 S 基因片段形成三螺旋 DNA 的热力学参数

	B1	B2	B3	B4	B5	B6
$K_a (x10^5 M^{-1})$	6.97	4.57	6.75	7.71	0.91	1.68
$K_d (x10^{-6} M)$	1.44	2.19	1.48	1.30	11.0	5.95
$\Delta G (-kcal/mol)$	8.42	8.16	8.4	8.48	5.71	7.53

从结果可见,在与乙型肝炎病毒的前S基因从3127至3143位的17bp基因片段作用时,TFO B1-B4的5'端11个核苷酸及3'端5个核苷酸都是序列相同的多聚嘌呤核苷酸,可分别与靶序列的5'端11bp及3'端5bp相作用,寡核苷酸B6只有5'端11个核苷酸可与靶双链DNA形成三螺旋DNA,而其3'端的8个多聚T碱基不能与靶双链DNA配对,结果如图3、图4及表1所示,TFO B6与乙肝病毒前S基因片段形成三螺旋DNA的量及其K_a值要明显少于寡核苷酸B1-B4,而与B5相近,说明寡核苷酸B1-B4的5'端及3'端的核苷酸均可以与靶双链DNA结合形成三螺旋DNA。

TFO B1-B4的5'端11个核苷酸及3'端5个核苷酸均是同样序列的多聚嘌呤核苷酸,只是其中第12位分别是T、C、A或G,通过它们分别与乙肝病毒基因前S片段形成三螺旋DNA的稳定性之间的差别,可以了解靶双链DNA均聚嘌呤链中插入单个胞嘧啶时其第三螺旋寡核苷酸中的相应位置应该用哪一种碱基与之配对。通过三螺旋DNA形成及凝胶阻滞试验,结果显示,TFO B4与乙肝病毒基因片段结合形成三螺旋DNA最稳定。因此,如果靶双链DNA的均聚嘌呤链中间有C碱基插入时,在均聚嘌呤的TFO上应用G碱基与之配对,形成GGC三碱基体较为稳定。

TFO B5只有11个核苷酸,TFO B1-B4有17个核苷酸,寡核苷酸B5虽然能与靶序列形成三螺旋DNA,但是稳定性比TFO B1-B4差。所以,相对于同一个靶双链DNA序列,TFO越长,它们所形成的三螺旋DNA越稳定,寡核苷酸的长度是决定三螺旋DNA稳定性的主要因素。

2-2-2 TFO与乙肝病毒DR区域两段相近均聚嘌呤/均聚嘧啶序列的作用

2-2-2-1 TFO与标记的乙肝病毒DR区域片段形成三螺旋DNA及凝胶阻滞分析

寡核苷酸片段Ⅲ经5'末端³²P标记后部分与片段Ⅳ复性,经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化得到³²P标记的寡核苷酸单链及³²P标记的乙肝病毒DR区

域双链片段。用合成的寡核苷酸与 ^{32}P 标记的乙肝病毒 DR 区域双链片段进行凝胶阻滞分析, 本发明设计合成的寡核苷酸 B11、B12、B13、B14、B15 均可与乙肝病毒基因 DR 片段形成三螺旋 DNA, 如图 5 所示。

2-2-2-2 寡核苷酸与乙肝病毒基因形成三螺旋 DNA 的平衡常数、解离常数及自由能变化

通过对放射自显影结果进行黑度扫描, 计算出三螺旋 DNA 形成反应平衡之后双链 DNA 及三螺旋 DNA 的浓度 $[b-f]$ 及 $[f]$, 然后, 以 $(\frac{f}{b-f})$ 对 a 作图,

可得一直线, 其斜率为 K_a , 如图 6 所示。通过 K_a 值计算 K_d 及 ΔG , $K_d = \frac{1}{K_a}$,

$\Delta G = -RT \ln K_a$ 。如表 2 所示:

表 2. TFO 与 HBV DR 基因片段形成三螺旋 DNA 的热力学参数

	B11	B12	B13	B14	B15
$K_a(\times 10^6 \text{M}^{-1})$	1.23	1.68	1.25	0.93	2.21
$K_d(\times 10^{-7} \text{M})$	8.11	5.94	8.02	10.7	4.52
$\Delta G(-\text{kcal/mol})$	8.78	8.97	8.79	8.6	9.14

乙型肝炎病毒 DR 区域的 1734 位至 1754 位的 21 bp 基因片段的 5' 端 11 bp 及 3' 端 8 bp 是均聚嘌呤/均聚嘧啶序列, 中间第 1745、1746 位插入两个 A.T 碱基对。TFO B11 的 11 个均聚嘌呤碱基能与靶 DNA 的 5' 端第一段均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合, TFO B12-B15 的 5' 端 11 个核苷酸及 3' 端 8 个核苷酸的寡聚嘌呤核苷酸分别可与靶双链 DNA 的两段均聚嘌呤/均聚嘧啶序列结合, 而中间各插入两个核苷酸 AA、GG、CC 和 TT。通过它们分别与乙肝病毒基因片段形成三螺旋 DNA 的稳定性之间的差别, 可以了解靶双链 DNA 的均聚嘌呤链中存在两个胸腺嘧啶时其第三螺旋寡核苷酸中的相应位置应该用哪一种碱基与之配对。通过三螺旋 DNA 形成及凝胶阻滞试验, 结果表明, 寡

核苷酸 B11 - B15 均可以与靶双链 DNA 结合形成三螺旋 DNA, 但是, 它们的稳定性却不同。TFO B13 与靶 DNA 结合形成三螺旋 DNA 的稳定性和 B11 与靶 DNA 结合形成三螺旋 DNA 的稳定性相近, 说明, TFO B13 只有 5'端的 11 个碱基参与三螺旋 DNA 的形成, 而 TFO B15 及 B12 与靶 DNA 形成三螺旋 DNA 的稳定性要明显高于 B11 与靶 DNA 形成三螺旋 DNA 的稳定性, 说明 TFO B15 及 B12 的 5'端 11 个核苷酸及 3'端 8 个核苷酸均参与三螺旋 DNA 的形成。而且, 插入 TT 比插入 AA 对在两段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列上形成三螺旋 DNA 的影响更小。TFO B14 与靶 DNA 结合形成三螺旋 DNA 的稳定性比 B11 与靶 DNA 结合形成三螺旋 DNA 的稳定性差, 表明 CC 的存在影响了两侧三螺旋 DNA 的稳定性。TFO B11 只有 11 个核苷酸, TFO B15 有 21 个核苷酸, 它们都能与靶序列形成三螺旋 DNA, 但是 TFO B15 与靶 DNA 形成三螺旋 DNA 的稳定性要明显比 TFO B11 高。所以, 相对于同一个靶双链 DNA 序列, TFO 越长, 它们所形成的三螺旋 DNA 越稳定。将 TFO B15 与 DR 区的靶 DNA 形成三螺旋 DNA 的稳定性与 TFO B4 与前 S 区的靶 DNA 形成三螺旋 DNA 的稳定性相比, TFO B15 与 DR 区的靶 DNA 形成三螺旋 DNA 的稳定性比 TFO B4 与前 S 区的靶 DNA 形成三螺旋 DNA 的稳定性高, B15 比 B4 更长, 也说明 TFO 越长, 它们所形成的三螺旋 DNA 越稳定。

实施例 3 三螺旋形成寡核苷酸 B4(3'P)和 B15(3'P)对乙型肝炎病毒基因表达的影响

3-1 实验步骤

3-1-1 质粒 DNA(p1.2II)及三螺旋形成寡核苷酸共转染 HepG₂ 细胞

HepG₂ 细胞培养于 1 × DMEM (含 10 % 胎牛血清) 培养液中, 37℃, 5 % CO₂ 培养, 转染前一天, 接种细胞于 96 孔板, 培养过夜, 转染前 2 小时换新鲜的培养液。配制溶液 A: 0.8 μg 质粒 p1.2II (由中国科学院上海生化所汪

垣教授提供), 及不同浓度的脱氧寡核苷酸 TFO B4(3'P)或 TFO B15(3'P), 脱氧寡核苷酸分别是 0、40、80、120、160、200 pmol。当转染体积是 20 μ l 时, 脱氧寡核苷酸的终浓度分别是 0、2、4、6、8、10 μ mol/L), 加 DMEM 至 10 μ l, 混匀; 溶液 B: 0.3 μ l lipofectin, 9.7 μ l DMEM, 混匀, 室温放置 30 分钟。溶液 A 和溶液 B 混匀, 室温放置 30 分钟。用 DMEM 洗细胞两次, 加入上述转染混合液 (每个样孔做 6 次, 其中 3 个样品的上清用于重复测定 HBsAg, 另三个样品的上清用于重复测定 HBeAg), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 5 小时, 加入 100 μ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 继续培养 120 小时, 取 100 μ l 细胞培养上清用于 HBsAg 及 HBeAg 的测定。

3-1-2 细胞培养上清中 HBsAg 及 HBeAg 的测定

在包被抗 HBs 或 HBe 反应板加入 100 μ l 待测标本, 并设 HBsAg 或 HBeAg 阳性对照 2 孔, 阴性对照 2 孔, 空白对照 1 孔, 然后每孔加入酶结合物 100 μ l (空白不加), 充分混匀, 封板。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。弃去反应板孔内液体, 用洗涤液注满每孔, 静置 20 秒钟, 甩干, 反复 5 次。然后每孔加底物液 100 μ l, 封板。37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟, 加终止液 50 μ l。最后, 在酶标仪上用空白孔校零, 读取各孔反应液在 492 毫微米的吸收 A_{492} 值。

3-1-3 三螺旋形成寡核苷酸对 HBsAg 及 HBeAg 抑制率的计算方法

$$\text{抑制率} = \frac{\text{不加寡核苷酸时的 } A_{492} - \text{加寡核苷酸时的 } A_{492}}{\text{不加寡核苷酸时的 } A_{492}} \times 100\%$$

3-2 实验结果及分析

3-2-1 三螺旋形成寡核苷酸与 HBV 质粒 DNA 共转染 HepG₂ 细胞时对 HBV 基因表达影响的时间效应

在 12 孔板培养 HepG₂ 细胞, 每个孔分别转染带有 HBV 基因质粒 p1.2II 10 μ g 及 10 μ mol/L 的 TFO B4(3'P)或 TFO B15(3'P), 每个样品重复 3 次, 并每隔

12 小时取 200 μ l 培养液, 其中 100 μ l 培养液用于测定 HBeAg, 另 100 μ l 培养液用于测定 HBsAg, 三次重复取平均值, 结果如图 7、图 8 所示。HBV 基因转染 HepG₂ 细胞后, 当不加三螺旋形成寡核苷酸时, HBeAg 及 HBsAg 在第二天开始表达, 随着时间的增加, 表达量逐步升高。当 10 μ mol/L TFO B4(3'P) 或 TFO B15(3'P) 与 HBV 质粒 DNA 共转染时, HBeAg 及 HBsAg 的表达比不加 TFO 时要明显降低, 尤其是加入 TFO B15(3'P) 时, 对 HBeAg 及 HBsAg 表达的抑制作用尤其显著, HBeAg 及 HBsAg 的表达量上升很慢。同时, 当加入对照寡核苷酸时, HBeAg 及 HBsAg 的表达量也有些降低, 这可能是由于 DNA 转染系统中的寡核苷酸影响了 HBV DNA 的转染效率, 因此, HBeAg 及 HBsAg 的表达量有所下降。但是, HBeAg 及 HBsAg 表达量下降的幅度要明显小于三螺旋形成寡核苷酸对 HBeAg 及 HBsAg 表达的抑制作用。

3-2-2 TFO B15(3'P) 在预转染 p1.2II 的 HepG₂ 细胞中, 对 HBV 抗原表达影响的时间效应

在 12 孔板培养 HepG₂ 细胞, 每个孔分别转染带有 HBV 基因质粒 p1.2II, 然后, 在细胞培养液中加入终浓度为 10 μ mol/L 的 TFO B15(3'P), 每个样品重复 3 次, 并每隔 10 小时取 200 μ l 培养液, 其中 100 μ l 培养液用于测定 HBeAg, 另 100 μ l 培养液用于测定 HBsAg, 三次重复取平均值, 结果如图 9、图 10 所示。HBV 基因转染 HepG₂ 细胞后, 当不加三螺旋形成寡核苷酸时, HBeAg 及 HBsAg 在第二天开始表达, 随着时间的增加, 表达量逐步升高。当细胞培养液中含 10 μ mol/L TFO B15(3'P) 时, HBsAg 的表达比不加 TFO 时要明显降低, 但是对 HBeAg 的影响较小。

实施例 4 三螺旋形成寡核苷酸对乙型肝炎病毒在 HepG₂ 细胞中繁殖的抑制作用

4-1 实验步骤

4-1-1 质粒 DNA 及三螺旋形成寡核苷酸的转染

HepG₂ 细胞培养于 1 × DMEM (含 10% 胎牛血清) 培养液中, 于 37℃, 5% CO₂ 培养, 转染前一天, 接种细胞于 12 孔板, 培养过夜, 转染前 5 小时换新鲜的培养液。配制溶液 A: 质粒 p1.2II 10 μg, 三螺旋形成寡核苷酸在转染混合液中的终浓度为 10 μmol/L, 加不含血清的 DMEM 至 110 μl, 混匀; 溶液 B: 6 μl lipofectin, 114 μl 不含血清的 DMEM, 混匀, 室温放置 30 分钟。用不含血清的 DMEM 洗细胞两次, 加入上述转染混合液(每个样品重复 3 次,), 37℃, 5% CO₂ 培养 5 小时, 加入 2ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 继续在 37℃, 5% CO₂ 培养 5 天。

4-1-2 细胞 DNA 的抽提

10 μmol/L 三螺旋形成寡核苷酸作用 5 天后, 用胰酶消化细胞, 合并重复三次的细胞, 在 4℃ 以 3000g 离心 2 分钟, 收集细胞于 1.5 ml Eppendorf 管中, 加入 1ml TRIzol 试剂, 充分混匀, 室温静置 5 分钟, 加入 0.2 ml 氯仿, 振荡 15 秒, 室温放置 2~3 分钟, 在 4℃ 以 1200g 离心 15 分钟, 将水相转移至另一个 1.5 ml Eppendorf 管中, 用于总 RNA 的抽提。在中层及下层有机相中加入 0.3 ml 无水乙醇, 混匀, 室温放置 5 分钟, 然后以 10,000g 离心 5 分钟, 弃上清, 加入 1 ml 0.1 mol/L 柠檬酸钠, 10% 乙醇溶液, 室温放置 30 分钟, 每 5 分钟混匀一次, 然后于 4℃, 以 10,000g 离心 5 分钟, 重复用 1 ml 0.1 mol/L 柠檬酸钠, 10% 乙醇溶液洗一次, 悬浮于 75% 乙醇中, 室温放置 20 分钟, 每 5 分钟摇动一次, 于 4℃, 10,000g 离心 5 分钟, 置于空气中干燥后, 加入 100 μl 8 mmol/L NaOH 溶解。

4-1-3 HBV 基因探针的制备

质粒 p1.2II 用 BamHI 酶切、电泳, 纯化出含 3.2 kb 长度的完整线性 HBV DNA, 用随机六核苷酸引物法制备 HBV DNA 探针, (参见: 分子克隆实验指南, 第二版, J. Sambrook & E. F. Fritsch 及 T. Maniatis 著, 金冬雁等译,

科学出版社，1986 年，502 - 504）。

4-1-4 用点杂交(Dot Blot)检测 HBV DNA

用抽滤加样器把变性的 DNA 样品点到尼龙膜上，用紫外交联于膜上，然后与 ^{32}P 标记的 HBV DNA 探针杂交。（参见：现代分子生物学实验技术，卢圣栋主编，高等教育出版社，1993 年，209 - 210）。

4-2 结果：三螺旋形成寡核苷酸对 HepG₂ 细胞中 HBV 基因拷贝数的影响

在 12 孔板培养 HepG₂ 细胞，每个孔分别转染带有 HBV 基因质粒 1.2II 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的三螺旋形成寡核苷酸 TFO B4(3'P)或 TFO B15(3'P)，每个样品重复 3 次，五天后消化细胞，抽提 DNA 做点杂交，结果如图 11 所示。从图中可以看出，用三螺旋形成寡核苷酸 TFO B4(3'P)或 TFO B15(3'P)作用的 HepG₂ 细胞中，其 HBV DNA 的拷贝数要少于不加三螺旋形成寡核苷酸及加不与 HBV DNA 配对的寡核苷酸的细胞中的拷贝数（杂交点直径小，黑度浅），说明三螺旋形成寡核苷酸可以抑制 HBV 的繁殖。

权 利 要 求

1.一种三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物,其特征在于该三螺旋形成寡核苷酸包括5条与HBV adr亚型的前S基因启动子区域结合的三螺旋形成寡核苷酸B1-B5,3条与HBV的DR区域结合的三螺旋形成寡核苷酸B11,B12及B15,它们的序列如下:

B1 5' AAG GAG GAG GAT GGA GG 3' 17nt
B2 5' AAG GAG GAG GAC GGA GG 3' 17nt
B3 5' AAG GAG GAG GAA GGA GG 3' 17nt
B4 5' AAG GAG GAG GAG GGA GG 3' 17nt
B5 5' AAG GAG GAG GA 3' 11nt
B11 5' AGA GGA GGG GG 3' 11nt
B12 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGG 3' 21nt
B15 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGG 3' 21nt.

2.根据权利要求1所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物,其特征在于该三螺旋形成寡核苷酸可以通过3'单磷酸化修饰得下列三螺旋形成寡核苷酸的修饰衍生物:

B1(3'P) 5' AAG GAG GAG GAT GGA GGp 3' 17nt
B2(3'P) 5' AAG GAG GAG GAC GGA GGp 3' 17nt
B3(3'P) 5' AAG GAG GAG GAA GGA GGp 3' 17nt
B4(3'P) 5' AAG GAG GAG GAG GGA GGp 3' 17nt
B5(3'P) 5' AAG GAG GAG GAp 3' 11nt
B11(3'P) 5' AGA GGA GGG GGp 3' 11nt
B12(3'P) 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGp 3' 21nt
B15(3'P) 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGp 3' 21nt.

3.一种含有权利要求1,2所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物的三螺旋DNA的结构,其特征在于它是由上述三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物

物与二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列形成的三螺旋 DNA 结构。

4.根据权利要求 3 所述的三螺旋 DNA 结构,其特征在於所述二段相近的均聚嘌呤/均聚嘧啶序列在 HBV 中是 DR 区域及 HBV adr 亚型的前 S 基因启动子区域。

5.一种含有权利要求 1 中所述的三螺旋形成寡核苷酸 B15 (或 B12, B11) 及其修饰衍生物的杂合三螺旋结构,其特征在於它是由所述的三螺旋形成寡核苷酸 B15(或 B12, B11)及其修饰衍生物和 DR 区域的负链序列寡核苷酸 AsDR 5' TCT CCT CCC CCA ACT CCT CCC3'或其修饰衍生物一起作用于 RNA 上的靶序列形成的(DNA)₂:RNA 杂合三螺旋结构。

6.一种含有权利要求 1 中所述的三螺旋形成寡核苷酸 B4 (或 B1, B2, B3, B5) 及其修饰衍生物的杂合三螺旋结构,其特征在於它是由所述的三螺旋形成寡核苷酸 B4(或 B1, B2, B3, B5)及其修饰衍生物和前 S 区域的负链序列寡核苷酸 AsPS 5'GGA GGC AGG AGG AGG AA 3'或其修饰衍生物一起作用于 RNA 上的靶序列形成的(DNA)₂:RNA 杂合三螺旋结构。

7.一种含有权利要求 2 中所述的三螺旋形成寡核苷酸的 3'单磷酸化修饰的衍生物 B15(3'P)或(B12(3'P),B11(3'P))的杂合三螺旋结构,其特征在於它是由所述的三螺旋形成寡核苷酸的 3'单磷酸化修饰的衍生物 B15(3'P)(或 B12(3'P),B11(3'P))和 DR 区域的负链序列寡核苷酸 AsDR(3'P) 5' TCT CCT CCC CCA ACT CCT CCCp3'一起作用于 RNA 上的靶序列形成的(DNA)₂:RNA 杂合三螺旋结构。

8.一种含有权利要求 2 中所述的三螺旋形成寡核苷酸的 3'单磷酸化修饰衍生物 B4(3'P)(或 B1(3'P),B2(3'P),B3(3'P),B5(3'P))的杂合三螺旋结构,其特征在於它是由所述的三螺旋形成寡核苷酸的 3'单磷酸化修饰的衍生物 B4(3'P)(或 B1(3'P),B2(3'P),B3(3'P),B5(3'P))和前 S 区域的负链序列寡核苷酸 AsPS(3'P) 5' GGA GGC AGG AGG AGG AAp 3'一起作用于 RNA 上的靶序列

形成的(DNA)₂:RNA 杂合三螺旋结构。

9.根据权利要求 1 所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物的应用,其特征不在于该三螺旋形成寡核苷酸含有下列序列之一:

- B1 5' AAG GAG GAG GAT GGA GG 3' 17nt
- B2 5' AAG GAG GAG GAC GGA GG 3' 17nt
- B3 5' AAG GAG GAG GAA GGA GG 3' 17nt
- B4 5' AAG GAG GAG GAG GGA GG 3' 17nt
- B5 5' AAG GAG GAG GA 3' 11nt
- B11 5' AGA GGA GGG GG 3' 11nt
- B12 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGG 3' 21nt
- B15 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGG 3' 21nt

可应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

10.根据权利要求 2 所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物的应用,其特征不在于该三螺旋形成寡核苷酸的 3'单磷酸化修饰衍生物含有下列序列之一:

- B1(3'P) 5' AAG GAG GAG GAT GGA GGp 3' 17nt
- B2(3'P) 5' AAG GAG GAG GAC GGA GGp 3' 17nt
- B3(3'P) 5' AAG GAG GAG GAA GGA GGp 3' 17nt
- B4(3'P) 5' AAG GAG GAG GAG GGA GGp 3' 17nt
- B5(3'P) 5' AAG GAG GAG GAp 3' 11nt
- B11(3'P) 5' AGA GGA GGG GGp 3' 11nt
- B12(3'P) 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGp 3' 21nt
- B15(3'P) 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGp 3' 21nt

可应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

11.根据权利要求 1 中所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物的应用,其特征不在于该三螺旋形成寡核苷酸含有下列序列之一:

- B1 5' AAG GAG GAG GAT GGA GG 3' 17nt

B2 5' AAG GAG GAG GAC GGA GG 3' 17nt

B3 5' AAG GAG GAG GAA GGA GG 3' 17nt

B4 5' AAG GAG GAG GAG GGA GG 3' 17nt

B5 5' AAG GAG GAG GA 3' 11nt

同时加入前S区域的负链序列脱氧寡核苷酸 AsPS 5'GGA GGC AGG AGG AGG AA 3'或其修饰衍生物,可应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

12.根据权利要求1中所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物的应用,其特征在于该三螺旋形成寡核苷酸含有下列序列之一:

B11 5' AGA GGA GGG GG 3' 11nt

B12 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGG 3' 21nt

B15 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGG 3' 21nt

同时加入DR区域的负链序列脱氧寡核苷酸 AsDR 5' TCT CCT CCC CCA ACT CCT CCC 3'或其修饰衍生物,可应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

13. 根据权利要求2中所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物的应用,其特征在于该三螺旋形成寡核苷酸的3'单磷酸化修饰衍生物含有下列序列之一:

B1(3'P) 5' AAG GAG GAG GAT GGA GGp 3' 17nt

B2(3'P) 5' AAG GAG GAG GAC GGA GGp 3' 17nt

B3(3'P) 5' AAG GAG GAG GAA GGA GGp 3' 17nt

B4(3'P) 5' AAG GAG GAG GAG GGA GGp 3' 17nt

B5(3'P) 5' AAG GAG GAG GAp 3' 11nt

同时加入前S区域的负链序列脱氧寡核苷酸 AsPS(3'P) 5'GGA GGC AGG AGG AGG AAp 3',可应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

14. 根据权利要求 2 中所述的三螺旋形成寡核苷酸及其修饰衍生物的应用, 其特征在于该三螺旋形成寡核苷酸的 3' 单磷酸化修饰衍生物含有下列序列之一:

B11(3'P) 5' AGA GGA GGG GGp 3' 11nt

B12(3'P) 5' AGA GGA GGG GGA AGA GGA GGGp 3' 21nt

B15(3'P) 5' AGA GGA GGG GGT TGA GGA GGGp 3' 21nt

同时加入 DR 区域的负链序列脱氧寡核苷酸 AsDR(3'P) 5' TCT CCT CCC CCA ACT CCT CCCp 3', 可应用于配制抑制乙肝病毒及治疗乙型肝炎的药物。

HBV 前 S 基因序列

3127 3143
 5' CA TTC CTC CTC CTG CCT CC AC 3' (片段 I) 21nt
 3' GT AAG GAG GAG GAC GGA GG TG 5' (片段 II) 21nt

TFO 序列

B1 5' AAG GAG GAG GAT GGA GG 3' 17nt
 B2 5' AAG GAG GAG GAC GGA GG 3' 17nt
 B3 5' AAG GAG GAG GAA GGA GG 3' 17nt
 B4 5' AAG GAG GAG GAG GGA GG 3' 17nt
 B5 5' AAG GAG GAG GA 3' 11nt
 B6 5' AAG GAG GAG GA TTT TTT TT 3' 19nt
 对照(NC) 5' GGG ATG CAG TGG TGG AAT TCC ACA 3' 24nt

图 1

HBV DR 序列

1734 1754
 5' AAT CTC CTC CCC CAA CTC CTC CCA G 3' (片段 III) 25nt
 3' TTA GAG GAG GGG GTT GAG GAG GGT C 5' (片段 IV) 25nt

TFO 序列

B11 5' A GAG GAG GGG G 3' 11nt
 B12 5' A GAG GAG GGG GAA GAG GAG GG 3' 21nt
 B13 5' A GAG GAG GGG GGG GAG GAG GG 3' 21nt
 B14 5' A GAG GAG GGG GCC GAG GAG GG 3' 21nt
 B15 5' A GAG GAG GGG GTT GAG GAG GG 3' 21nt

图 2

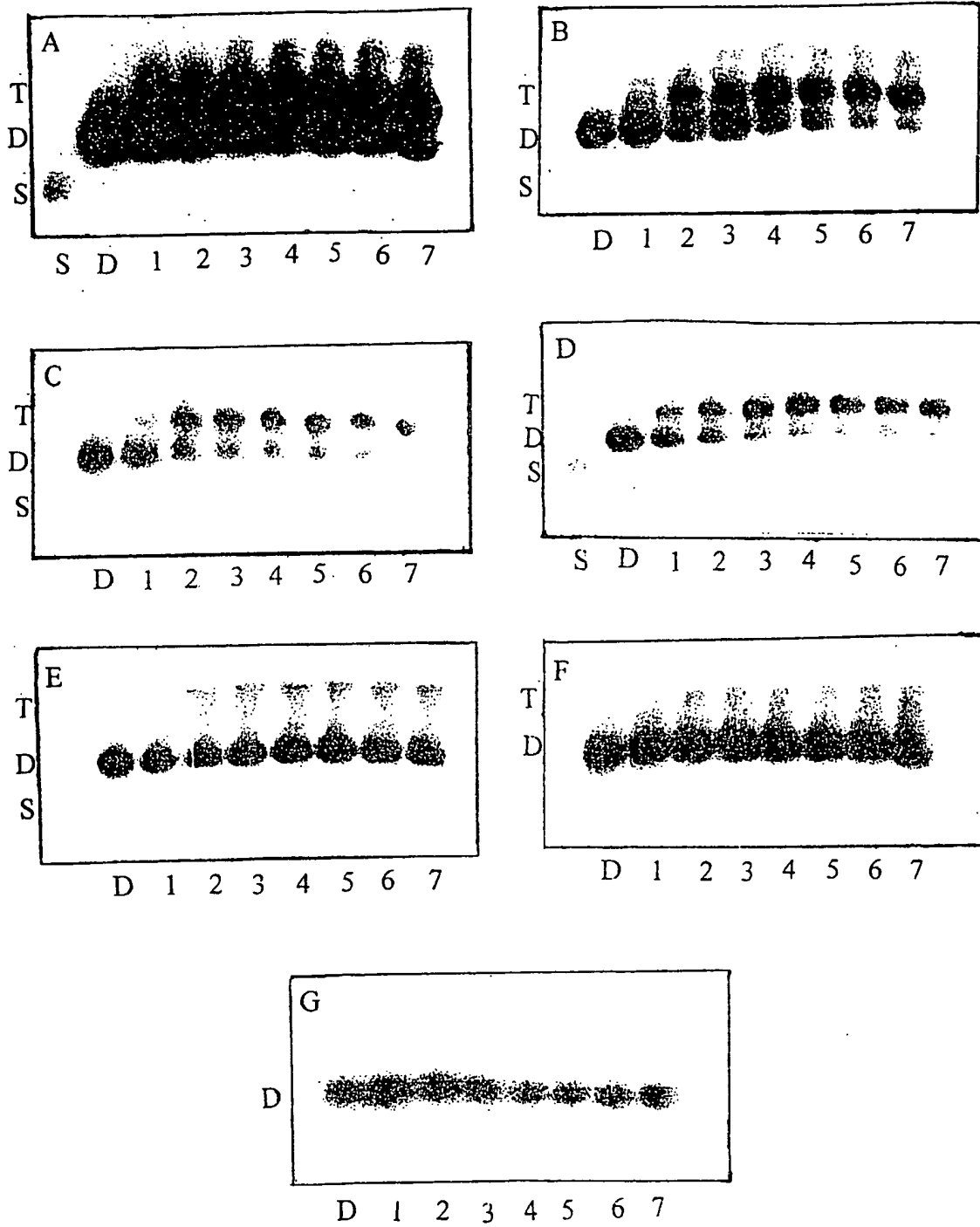


图 3

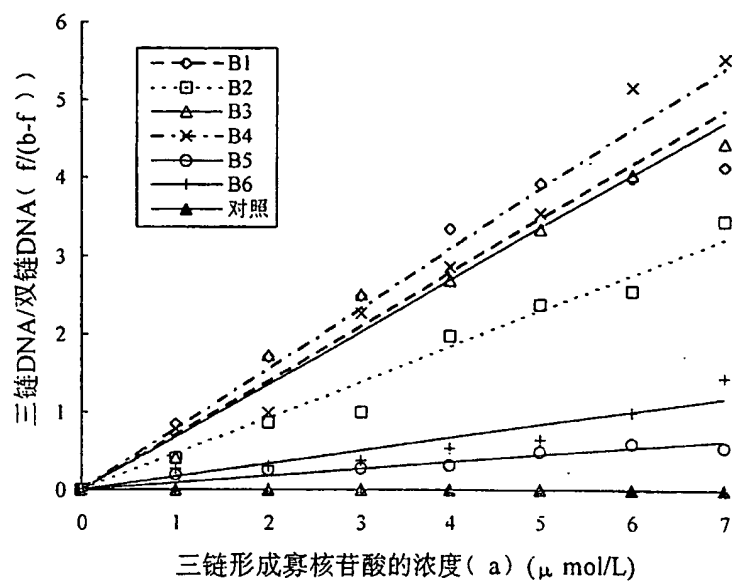


图 4

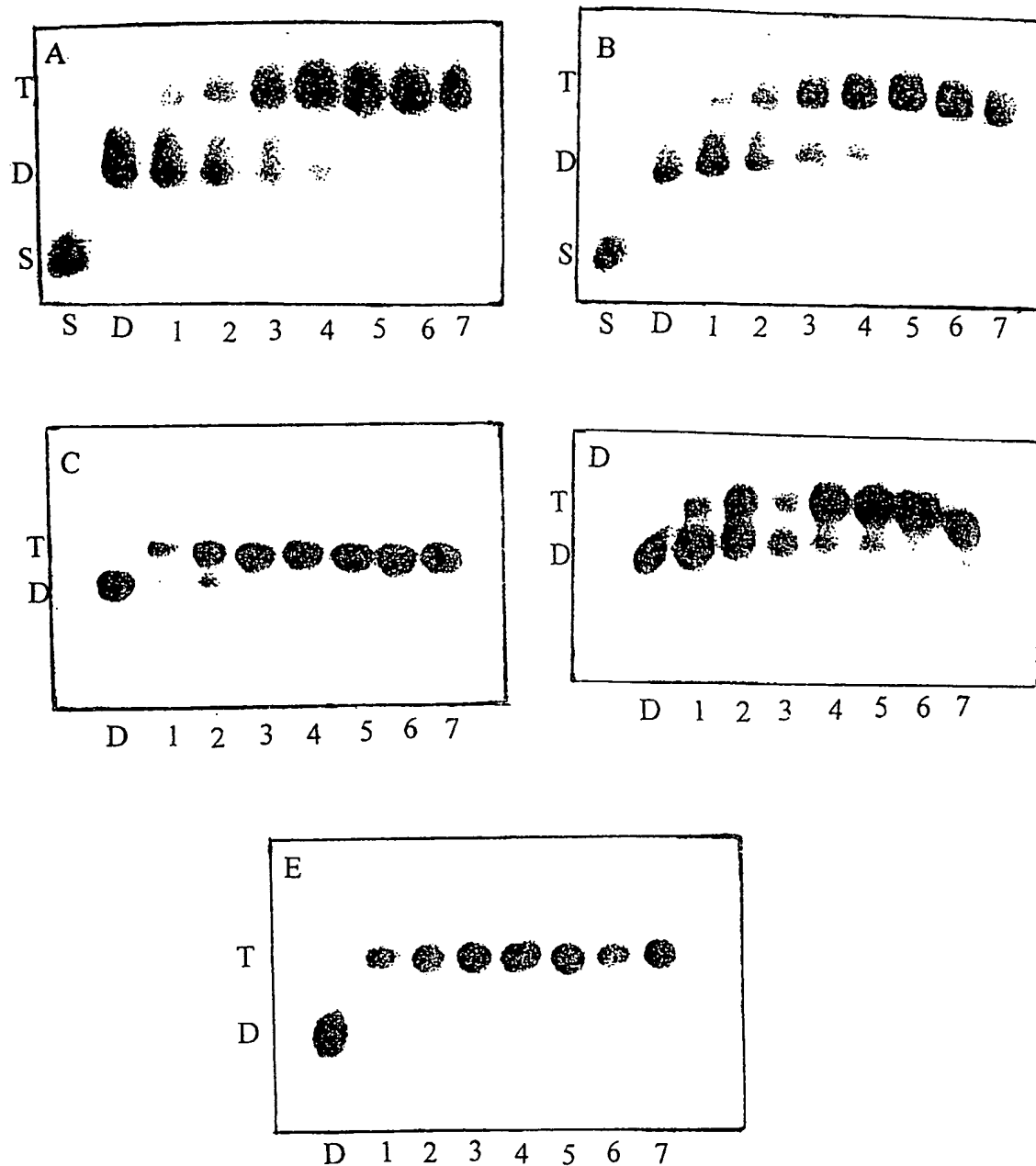


图 5

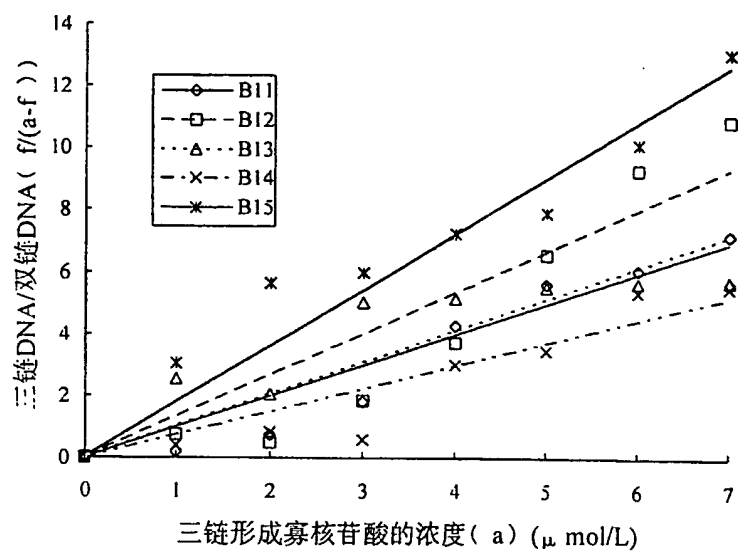


图 6

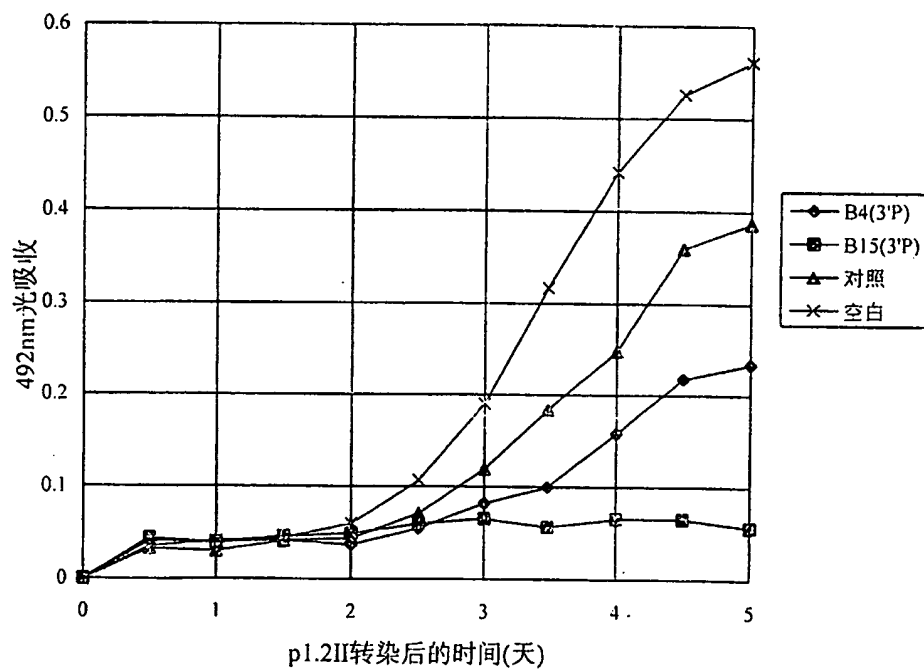


图 7

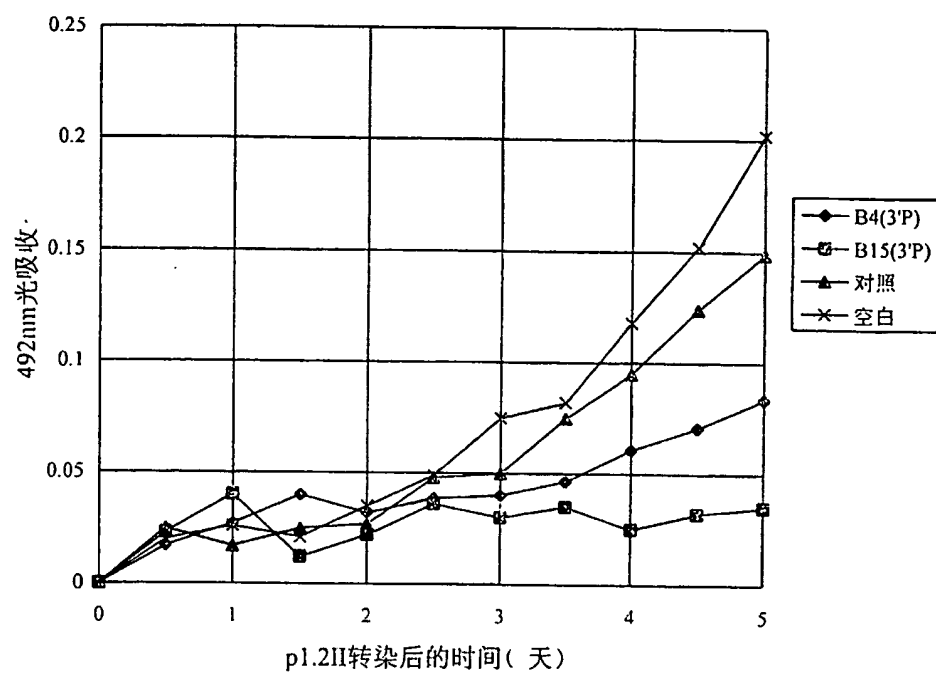


图 8

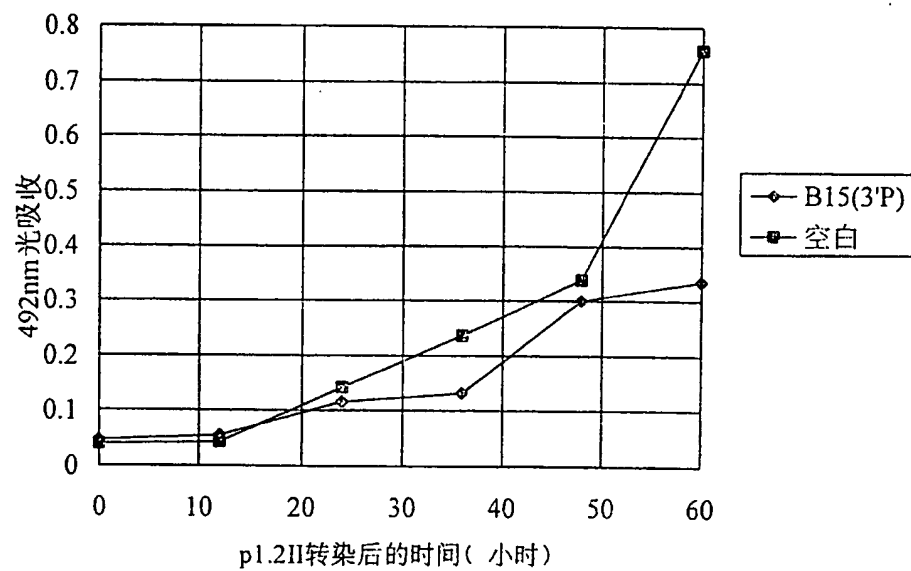


图 9

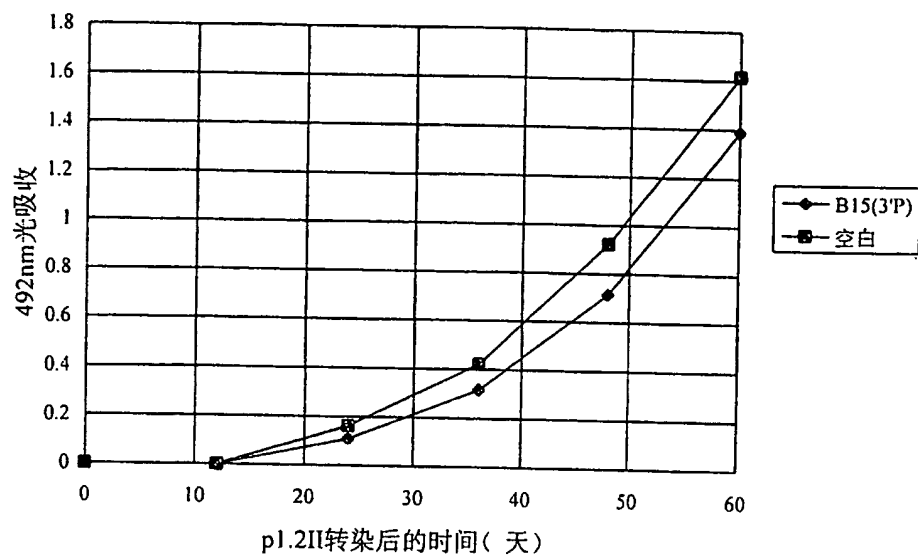


图 10

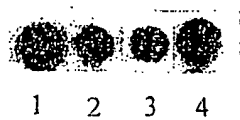


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 98/00248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H21/00,21/04

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED C07H21/00,21/04

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁸C07H21/00,21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

The Chinese Patent

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

EPOQUE,CPRS,oligonucleotide,triplex,HBV

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	CN 1122138A 8 May 1996	1-8
A	WO 96/40710 A1 19 December 1996	1-8
A	WO 95/19433 A2 20 July 1995	1-14
A	WO 96/39502 A1 12 December 1996	1-14
A	WO 97/03211 A1 30 January 1997	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 January 1999

Date of mailing of the international search report

28 JAN 1999

(28.01.1999)

Name and mailing address of the ISA/
State Intellectual Property Office of China
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Authorized officer Liu Yawen

Telephone No. 86-10-62093843

Facsimile No. 86-10-62019451

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN 98/00248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
CN 1122138A	8-05-1996	US- A-5739308	14-04-1998
		AU-B- 684748	08-01-1998
		EP -A-0680489	08-11-1995
		FI-A-953510	24-08-1995
		JP-T-8505778	25-06-1996
WO-A-9640710	19-12-1996	US-A- 5693773	02-12-1997
		AU-A- 6255896	30-12-1996
WO-A-9519433	20-07-1995	US-A-5728518	17-03-1998
		JP-T-9511382	18-11-1997
		EP-A-0739415	30-10-1996
		CA-A-2180347	20-07-1995
		AU-A-1680095	01-08-1995
WO-A-9639502	12-12-1996	EP-A-0832211	01-04-1998
		AU-A-6125296	14-12-1996
WO-A-9703211	30-01-1997	EP-A-0837951	29-04-1998
		AU-A-6479696	10-02-1997

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 98/00248

A. 主题的分类

C07H 21/00, 21/04

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域 C07H 21/00, 21/04

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁶C07H21/00,21/04

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

EPOQUE, CPRS, 寡核苷酸, 三螺旋, HBV

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	CN 1122138 A 8 May 1996	1-8
A	WO 96/40710 A1 19 December 1996	1-8
A	WO 95/19433 A2 20 July 1995	1-14
A	WO 96/39502 A1 12 December 1996	1-14
A	WO 97/03211 A1 30 January 1997	1-14

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术, 不认为是特别相关的文件
“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的
“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

16 日 1 月 1999(16.1.99)

国际检索报告邮寄日期

28 日 1 月 1999(28.01.99)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

刘亚文

电话号码: 86-10-62093843

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN 98/00248

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN 1122138A	8-05-1996	US- A-5739308	14-04-1998
		AU-B- 684748	08-01-1998
		EP -A-0680489	08-11-1995
		FI-A-953510	24-08-1995
		JP-T-8505778	25-06-1996
WO-A-9640710	19-12-1996	US-A- 5693773	02-12-1997
		AU-A- 6255896	30-12-1996
WO-A-9519433	20-07-1995	US-A-5728518	17-03-1998
		JP-T-9511382	18-11-1997
		EP-A-0739415	30-10-1996
		CA-A-2180347	20-07-1995
		AU-A-1680095	01-08-1995
WO-A-9639502	12-12-1996	EP-A-0832211	01-04-1998
		AU-A-6125296	14-12-1996
WO-A-9703211	30-01-1997	EP-A-0837951	29-04-1998
		AU-A-6479696	10-02-1997

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.